

2013 年度 修士論文要旨

# CDK 活性が pRB の制御を外れた E2F 活性に及ぼす影響の解析

関西学院大学大学院 理工学研究科  
生命科学専攻 大谷研究室 城本あゆみ

転写因子 E2F は代表的ながん抑制因子 pRB の主な標的であり、細胞増殖に中心的な役割を果たすだけでなく、がん化抑制にも重要な役割を果たしている。増殖刺激により CDK が活性化されると、pRB がリン酸化され不活性化されることで、E2F は生理的に活性化される。生理的に活性化された E2F は、*Cdc6* 等の増殖関連遺伝子を発現誘導し細胞増殖を促進する。一方、代表的ながん性変化の 1 つである pRB の機能欠損が生じると、E2F は pRB の制御を外れて活性化され、生理的に活性化された E2F は活性化しない、がん抑制遺伝子 *ARF* や *TAp73* を特異的に発現誘導し、アポトーシスや細胞周期停止を誘導することでがん化抑制に働く。しかし、E2F が細胞増殖とがん化抑制という正反対の働きを仕分ける機構の詳細は明らかにされていない。先行研究において、増殖刺激によって生理的に誘導された E2F1 は高度にリン酸化されているが、がん性変化を模倣した E2F1 の過剰発現またはアデノウイルス E1a による pRB の強制的な不活性化によって pRB の制御を外れた E2F1 活性を生じさせると、両者に共通して低リン酸化型の E2F1 が誘導されることが見出された。このことから、E2F1 は自身のリン酸化の違いによって、標的遺伝子を仕分けている可能性が考えられた。そこで、このリン酸化に関与するキナーゼの候補として RB 経路において pRB の上流に位置する CDK に着目した。CDK は RB の生理的な不活性化による E2F の生理的な活性化に寄与するが、CDK 活性が pRB の制御を外れた E2F 活性および標的遺伝子の発現誘導に及ぼす影響は明らかではない。本研究は、CDK 活性が pRB の制御を外れた E2F 活性に与える影響を明らかにすることを目的とし、低リン酸化型であると示唆される pRB の制御を外れた E2F を、CDK がリン酸化することで高リン酸化型の生理的な E2F に変換しているのではないかと仮説を立てて進めた。

CDK 活性を亢進させると、pRB の制御を外れた E2F が高リン酸化型の生理的な E2F に変換されるのではないかと推測し、pRB の制御を外れた E2F 活性に減少が見られるか否かを検証した。ヒト正常線維芽細胞 HFF を用いたルシフェラーゼアッセイで、E2F1 の過剰発現による *ARF*、*TAp73* プロモーターの活性化は、cyclin D1/CDK4 を E2F1 と共に過剰発現させることによって抑制された。また qRT-PCR で、内在性の *ARF* 遺伝子においても、E2F1 の過剰発現で発現量が増加したが、cyclin D1/CDK4 を共発現させるとその発現量に減少が見られた。反対に、CDK 活性を抑制すると、両 E2F の変換が行われなくなるのではないかと推測し、pRB の制御を外れた E2F 活性に増加が見られるか否かを検証した。元々 pRB の制御を外れた E2F 活性が生じており、CDK 活性が亢進していると予想される pRB 欠損がん細胞株 Saos-2 において CDK インヒビター p21<sup>cip1</sup> を過剰発現させると、*ARF*、*TAp73* プロモーターの活性化が認められただけでなく、内在性の *ARF*、*TAp73* 遺伝子および *ARF* タンパク質の発現の増加も認められた。さらに、Saos-2 において薬剤性の CDK インヒビターである Flavopiridol 処理を施し CDK 活性を抑制すると、*ARF* 遺伝子の発現量に増加が認められた。

以上から、cyclin D1/CDK4 による E2F1 のリン酸化の程度の変化の検証を要するが、cyclin D1/CDK4 活性は pRB の制御を外れた E2F1 活性に対して抑制的に働く可能性が強く示唆された。